

spannungselektrophorese (9) und der Chromatographie mit Ionenaustauschpapier (8) bedienen oder aber auf den antifibrinolytischen Eigenschaften der EACS beruhen (13) sind jedoch vielfach für das klinische Routinelaboratorium zu zeitraubend und zu kompliziert. Meist beanspruchen sie recht erhebliche Serum-Mengen, eine Voraussetzung, die ihre Anwendung im Kindesalter weitgehend ausschließt.

Demgegenüber läßt sich die EACS mit Hilfe der beschriebenen, eindimensionalen Dünnschichtchromatographischen Technik im Zeitraum von knapp 3 Stunden ohne großen Aufwand und mit guter Genauigkeit bereits in mit Schnepferstich entnommenem Blut und

noch kleineren Mengen Urin quantitativ erfassen. Diese Faktoren erlauben uns, auch auf frühen Altersstufen bei ein- und demselben Patienten zahlreiche Bestimmungen zur Verfolgung der EACS-Konzentration in Serum und Urin nach einer peroralen oder parenteralen Belastung durchzuführen, weshalb sich diese Methode nicht nur zur Kontrolle des therapeutischen Erfolges mit EACS bei Blutungsübeln, sondern auch zum Studium der pharmakologischen Wirksamkeit dieser Aminosäure eignen dürfte.

Wir möchten Frau A. KIENER für die sehr sorgfältige Ausführung der Versuche und ihre wertvolle technische Mitarbeit auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.

Literatur

1. ABLONDI, F. B., J. J. HOGAN, M. PHILIPS und E. C. DE RENZO, Arch. Biochemistry 82, 153 (1959). — 2. YOKOI, M., J. Physiol. Soc. Japan 22, 1098 (1960). — 3. YOKOI, M., J. physiol. Soc. Japan 22, 1103 (1960). — 4. McNICOL, G. P., A. P. FLETCHER, N. ALKAERSIG und S. SHERRY, J. Urol., Baltimore 86, 829 (1961). — 5. NILSSON, I. M., S. E. BJÖRKMAN und L. ANDERSON, Acta med. Scand. 170, 487 (1961). — 6. ROTH, F., Geburtsh. u. Frauenhk. 10, 975 (1962). — 7. WINZELER, H., W. REIF, R. SCHMUTZLER und W. ZOLLRÜGER, Gynaecologia 55, 132 (1963). — 8. McNICOL, G. P., A. P. FLETCHER, N. ALKAERSIG und S. SHERRY, J. Laborat.

Clin. Med., S. Louis 59, 7 (1962). — 9. SJOERDSMA, A. und A. HANSON, Acta Chem. scand. 13, 2150 (1959). — 10. STEGEMANN, H., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 319, 87 (1960). — 11. STEGEMANN, H., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 319, 102 (1960). — 12. THOMAS, K., K. STALDER und H. STEGEMANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 317, 267 (1959). — 13. WOLOSOWICZ, N., ST. NIEWIAROWSKI und K. CZEREPKI, Thromb. Diath. Haemorrh., 10, 309 (1964). — 14. MOORE, ST. und W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 176, 367 (1948). — 15. STAHL, E., Dünnschichtchromatographie. Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg (1962).

Dr. H. Käser
Institut f. klin. Eiweißforschung
der Universität. Tiefenau
3004 Bern/Tiefenau, Schweiz

Bestimmung von Phenylalanin und Tyrosin nach Oxydation mit Kaliumpermanganat

VON H. LUBS UND H.-H. HEIMANN

*Aus der Forschungsstelle für Medizinische Ernährungslehre an der Hautklinik der Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald (Direktor: Prof. Dr. med. habil A. Knapp)*

(Der Schriftleitung zugegangen am 5. September 1964)

Bei Oxydationsversuchen mit KMnO_4 konnte in cyanidhaltigem Citratpuffer von pH = 4,25 eine Zerstörung von Tyrosin beobachtet werden. Versuche mit Phenylalanin-Tyrosin-Gemischen ergaben, daß auch in diesen nur Tyrosin angegriffen wird, während Phenylalanin beständig ist. Die sich daraus ergebende Bestimmungsmethode mit der Ninhydrinreaktion wird erläutert.

Tyrosine is destroyed by KMnO_4 in cyanide-containing citrate buffer at pH 4.25. In mixtures of phenylalanine and tyrosine, only tyrosine is attacked, while phenylalanine is stable. An assay with ninhydrin, employing the above reaction, is described.

Bei klinischen und biochemischen Untersuchungen der Oligophrenia phenylpyruvica beschäftigten wir uns mit der Analytik von Phenylalanin und Tyrosin. Bisher sind zur Bestimmung von Aminosäuren eine ganze Anzahl von Verfahren mitgeteilt worden. Von den Farbreaktionen dürfte die Ninhydrinfärbung nach MOORE und STEIN (1) zu den zuverlässigsten Methoden gehören. In ihrer Anwendung auf Aminosäuregemische ist jedoch eine genaue Auftrennung der Aminosäuren erforderlich. Bei der Bestimmung einer größeren Anzahl von Aminosäuren kommt vorwiegend die Ionenaustauschchromatographie an Polystyrolharzen in Frage (2—6). Sie wird

allerdings zu material- und zeitaufwendig, wenn nur 1—2 Aminosäuren in einem Gemisch freier Aminosäuren quantitativ bestimmt werden sollen.

Ziel unserer Untersuchungen war es, eine vereinfachte Methode zur Bestimmung von Phenylalanin und Tyrosin unter Anwendung der Farbreaktion von MOORE und STEIN zu finden. Dazu wurde versucht, aus einer Gesamtbestimmung von Phenylalanin und Tyrosin und anschließender oxydativer Zerstörung des Tyrosins eine quantitative Bestimmung auszuarbeiten. Zur Oxydation von Aminosäuren wurden bisher u. a. Peroxydisulfat (7) und Kaliumpermanganat verwandt (8). Wir wählten

Kaliumpermanganat, das nach den Angaben von KAPPELLER-ADLER (9) sowie KUHN und DESNUELLE (10) Tyrosin zerstört und so eine Phenylalaninbestimmung mit Ninhydrin ermöglicht.

Versuche

Entsprechend der Verfahrensweise von MOORE und STEIN (1) arbeiteten wir mit Flüssigkeitsvolumina von 2 ml. Die Aminosäuren wurden in 0,2 m Natriumcitratpuffer (6) pH = 4,25 gelöst. Nach den Angaben von SCHWERTFEGER (11) verwandten wir cyanidhaltigen Citratpuffer (4 ml/ 0,01 m KCN-Lösung/300 ml/ Puffer) und verzichteten auf den Hydrindantinzusatz zum Ninhydrinreagens. In den 2 ml-Proben mit einer Konzentration zwischen 10 und 100 μ g Phenylalanin, Tyrosin bzw. dem Gemisch beider Aminosäuren, wurde in Mehrfachbestimmungen ohne und mit Kaliumpermanganatzusatz die Extinktion nach der Ninhydrinreaktion gemessen. Wir arbeiteten mit dem Pulfrich-Photometer und dem Zusatzgerät „Elpho II“ bei einer Schichtdicke von 0,5 cm mit dem Filter S 57. Durch Aufnahme der typischen Farbkurven mit verschiedenen Filtern wurde sichergestellt, daß keine Verschiebung der Extinktionsmaxima eintrat.

Vor Beginn der Oxydationsversuche an Lösungen steigen der Aminosäurekonzentration war die Ermittlung der günstigsten Kaliumpermanganatkonzentration erforderlich. Diese Vorversuche wurden an Tyrosinlösungen mit einer Konzentration von 100 μ g/2 ml durchgeführt.

Durchführung

Im Reagensglas werden zu 2 ml/ Untersuchungslösung 0,2 ml/ 2-proz. Kaliumpermanganatlösung aus einer Mikrobürette gegeben, gut durchmischt und 10 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird das Reagensglas mit folienumwickelten Stopfen versehen und 10 Min. im siedenden Wasser gekocht. Dabei verschwindet die rote Farbe des Permanganat-Ions, und die Lösung wird farblos. Darauf läßt man die Lösung abkühlen, versetzt mit 1 ml/ Ninhydrinreagens (4 g Ninhydrin in einem Gemisch von 150 ml/ Äthylcellosolve und 50 ml/ 4-n-Natriumacetatpuffer pH = 5,5) kocht die zugestopften Reagensgläser 15 Min. im Wasserbad zur Farbentwicklung und kühlt erneut ab. Die rotviolett bis blau gefärbte Lösung wird nun mit 4 ml/ eines Alkohol/ Wassergemisches (1:1) versetzt, 30 Sek. auf der Schüttelmaschine durchmischt und die Extinktion gemessen.

Bei den nichtoxydierten Vergleichslösungen fiel der Zusatz von Kaliumpermanganat fort. Die Ninhydrinreaktion wurde, wie vorher beschrieben, durchgeführt. Alle Messungen erfolgten gegen einen Leerwert, dessen Herstellung in der oben angegebenen Weise erfolgte. An Stelle der aminosäurehaltigen Lösung wurden 2 ml/ 0,2 m cyanidhaltigen Citratpuffers pH = 4,25 eingesetzt. Die Einhaltung des pH-Bereiches von 4,2–5,0 ist zu beachten, da bei Überschreitung eine starke Braunfärbung die Messungen erschwert.

Ergebnisse

Die Abbildung 1 zeigt die Einwirkung von Kaliumpermanganatlösungen verschiedener Konzentration auf Tyrosin bei einer Konzentration von 100 μ g in 2 ml/ cyanidhaltigem Citratpuffer pH = 4,25 (Küvetten-schichtdicke 0,2 cm). Aus der Kurve ist zu entnehmen, daß der günstigste Bereich zwischen 1,5 und 2% liegt; wir wählten für unsere Oxydationsversuche eine 2-proz. Kaliumpermanganatlösung.

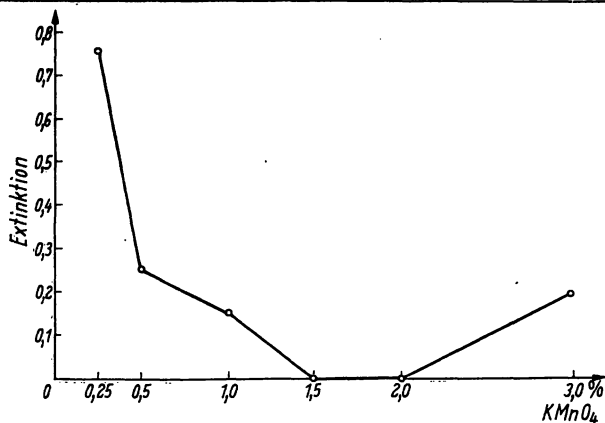


Abb. 1

Aus Abbildung 2 geht die Einwirkung von 0,2 ml/ 2-proz. Kaliumpermanganatlösung auf Tyrosin im Konzentrationsbereich 10–100 μ g/2 ml hervor. Die Extinktions-/Konzentrationskurve zeigt keine Konzentrationsabhängigkeit für die oxydierte Tyrosinlösung. Die Extinktionen liegen unter 0,05 (\times — \times oxydiert; \bullet — \bullet nicht oxydiert).

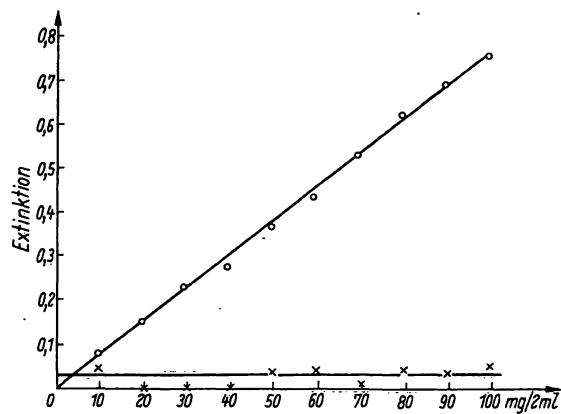


Abb. 2

Anschließend wurde die Kaliumpermanganateinwirkung an Phenylalanin-/Tyrosingemischen überprüft. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 3. Die nicht oxydierte Phenylalanin-/Tyrosinlösung (\bullet — \bullet) mit einer Konzentration von je 10, 20, . . . μ g Tyrosin und Phenylalanin in 2 ml/ ergab eine steile Gerade. Zum Vergleich sind die Meßwerte einer nicht oxydierten Phenylalaninlösung (\bullet — \bullet) eingetragen. Die Werte des oxydierten

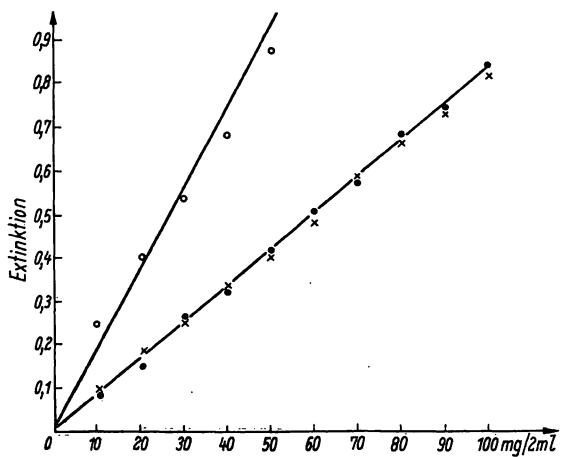


Abb. 3

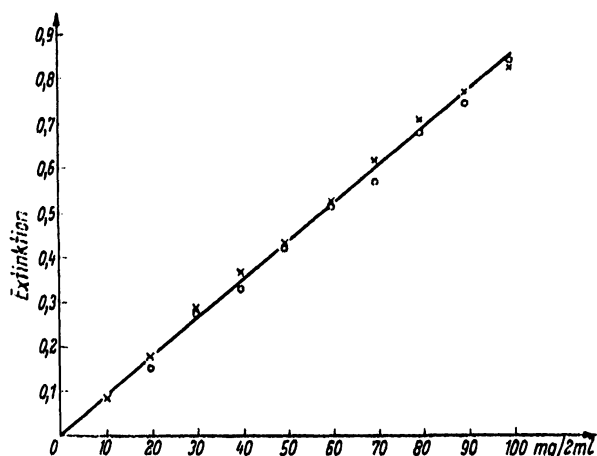


Abb. 4

Gemisches liegen mit denen der nicht oxydierten Phenylalaninlösung auf einer Geraden. Es ist also nur der Tyrosinanteil zerstört worden.

In der Abbildung 4 ist die Einwirkung von Kaliumpermanganat unter vorgenannten Versuchsbedingungen auf Phenylalanin im Konzentrationsbereich 10–100 $\mu\text{g}/2\text{ ml}$ dargestellt. Auch hier wurde zum Vergleich eine nicht oxydierte Phenylalaninlösung in steigender Konzentration eingezeichnet. Die Übereinstimmung der Meßpunkte von oxydierter und nicht oxydierter Lösung bestätigen, daß Phenylalanin nicht angegriffen wird. Eine Überprüfung der Farbkurven ergab für alle Versuchsreihen ein Extinktionsmaximum für das Filter S 57, während die oxydierte Tyrosinlösung keine nennenswerte Absorption erkennen läßt.

Abbildung 5 zeigt die Farbkurve einer Tyrosinlösung ($c = 100 \mu\text{g}/2\text{ ml}$) nach Ninhydrinreaktion ($\circ - \circ$) und die entsprechenden Werte nach der Oxydation mit Kaliumpermanganat ($\times - \times$).

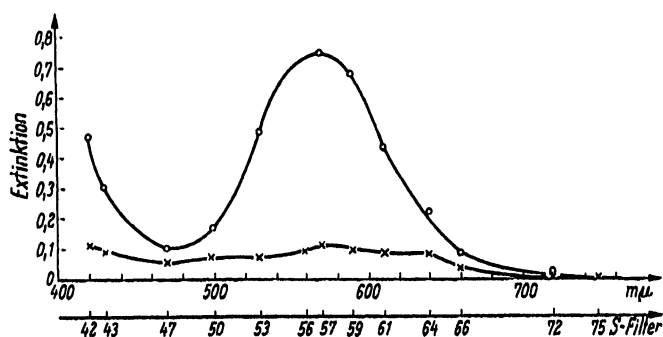


Abb. 5

Wiederfindensversuche mit der vorher beschriebenen Methode an synthetischen Gemischen von Phenylalanin und Tyrosin ergaben die in der Tabelle aufgeführten Werte:

μg eingesetzt		wiedergefunden Phenylalanin	
Phenylalanin	Tyrosin	μg	%
10	20	10	100
20	40	21	105
30	30	31	103
50	50	49	98

Nach achtmaliger Bestimmung einer oxydierten Phenylalanin-/Tyrosin-Lösung ($50 \mu\text{g}/50 \mu\text{g}$) wurden folgende statistischen Werte errechnet: Mittelwert $\bar{x} = 50,6$; Standardabweichung $S = \pm 1,3$; Mittlerer Fehler des Mittelwertes $S\bar{x} = \pm 0,547$; Variabilitätskoeffizient $V = 2,6\%$. Weitere Angaben sind für eine spätere Mitteilung vorgesehen.

Diskussion

Die an Lösungen der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin durchgeführten Oxydationsversuche mit Kaliumpermanganat zeigen, daß unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen Tyrosin zerstört wird, während Phenylalanin beständig ist. Auf dieser Basis ist eine Bestimmung von Mikromengen Phenylalanin und Tyrosin nebeneinander möglich. Die Differenz im Neigungswinkel der Geraden von Tyrosin und Phenylalanin ist auf die bekannte unterschiedliche Farbausbeute bei der Ninhydrinreaktion zurückzuführen (1). Gegenüber älteren Methoden (7, 8) ist neben der Vereinfachung die hohe Empfindlichkeit der Ninhydrinreaktion von Vorteil. Wesentlich ist auch die Zeiteinsparung, die sich aus der verringerten Zahl an Einzeloperationen ergibt. Eine eingearbeitete Kraft und eine Hilfskraft können in 75 Minuten 24 Analysen durchführen. — Möglichkeiten einer Anwendung auf biochemische Aufgabenstellungen, die eine vorhergehende Abtrennung des Phenylalanins und Tyrosins von den übrigen Aminosäuren erfordert, werden zur Zeit geprüft.

Für die technische Assistenz bei der Durchführung dieser Arbeit danken wir Fräulein VOLKMER.

Literatur

1. MOORE, S. und W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 211, 907 (1954).
2. MOORE, S. und W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 192 663 (1951).
3. MOORE, S. und W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 211, 893 (1954).
4. MOORE, S., D. H. SPACKMANN und W. H. STEIN, Analytic. Chem. 30, 1185 (1958).
5. KRAMPITZ, G., R. MÜLLER und M. VOLLMERS, Z. Tierphysiol. Tierernähr., Futtermittelkunde 14, 311 (1959).
6. SCHORMÜLLER, J., H. D. BILTZ und

- G. ADLER, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 109, 129 (1959).
7. LANG, K., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 241, 68 (1936).
8. VOLLMANN, G., Biochem. Z. 194, 2 (1938).
9. KAPLEBER-ADLER, R., Biochem. Z. 252, 185 (1932).
10. KUHN, R. und P. DESNUELLE, in: Hinsberg-Lang: Medizinische Chemie S. 865, Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien (1957).
11. SCHWIBDTPFEGGER, E., J. Chromatogr. (Amsterdam) 7, 418 (1962).

Dipl.-Chem. H. Lubs

Forschungsstelle f. Med. Ernährungslehre
an der Univ.-Hautklinik Greifswald
Pfeichmannstr. 44